

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914

N° 4

Contribution à l'étude de l'action
du
bacille bulgare sur la flore intestinale

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université
de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le 14 Février 1914

PAR

MARCEL BECQUET

Pharmacien de 1^{re} Classe

JURY : MM. GRIMBERT, Président ; LEBEAU, Professeur ;
LUTZ, Agrégé.

H A V R E

Imprimerie du HAVRE-ÉCLAIR, 11, rue de la Bourse



1914

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914

N° 4

Contribution à l'étude de l'action
du
bacille bulgare sur la flore intestinale

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université
de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le 14 Février 1914

PAR

MARCEL BECQUET

Pharmacien de 1^{re} Classe

JURY : MM. GRIMBERT, Président ; LEBEAU, Professeur ;
LUTZ, Agrégé.

HAVRE

Imprimerie du HAVRE-ÉCLAIR, 11, rue de la Bourse



1914



PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GAUTIER, Directeur, *, 🌿 I.
BOURQUELOT, Assesseur, *, 🌿 I.
E. MUSSON, Secrétaire, *, 🌿 I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut,	
O. *, § 1.....	Botanique générale.
VILLIERS, *, § 1.....	Chimie analytique.
BOURQUELOT, *, § 1.....	Pharmacie galénique.
GAUTIER, *, § 1.....	Chimie minérale.
RADAIS, *, § 1.....	Cryptogamie.
BEHAL, O. *, § 1.....	Chimie organique.
PERROT, *, § 1.....	Matière médicale.
COUTIERE, *, § 1.....	Zoologie.
BERTHELOT, § 1.....	Physique.
GRIMBERT, *, § 1.....	Chimie biologique.
MOUREU, Membre de l'Institut,	
*, § 1.....	Pharmacie chimique.
LEBEAU, § 1.....	Toxicologie.
DELEPINE, § 1.....	Hydrologie et hygiène.

Directeur honoraire : M. GUIGNARD, O. I.

Professeurs honoraire :

MM. JUNGFL^{ES}CH, O. ✱, ☼ I. et BOUCHARDAT, O. ✱, ☼ I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET,  I.	MM. GUERIN,  I.
VALEUR,  I.	GUEGUEN,  I.
BOUGAULT,  I.	LUTZ,  I.
TASSILLY,  I.	HERTSEY,  I.

CHARGÉS DE COURS

MM. GUERBET, 	I.....	Minéralogie.
HONNORAT, 	I.....	Législation et déontologie pharmaceutiques.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ,  I.....	Chimie générale.
COUSIN,  I.....	Chimie analytique.
SOUEGES,  A.....	Micrographie.
MOURLOT,  I.....	Physique.
BARTHELAT,  I.....	Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER,  I.

Bibliothécaire en chef : M. DORVEAUX,  I.

A ma Femme

A MON MAITRE

MONSIEUR LE DOCTEUR L. GRIMBERT

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE PARIS

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

En soumettant ce petit travail à notre jury, nous ne saurions considérer notre tâche comme terminée sans adresser à notre vénéré Maître, M. le professeur Grimbert, l'expression de notre plus vive gratitude pour avoir bien voulu guider nos pas dans ces recherches et nous avoir secondé de ses précieux conseils.

Nous n'oublierons jamais l'intérêt qu'il a bien voulu nous porter pendant les deux années qu'ont duré nos expériences ; aussi le prions-nous instamment d'accepter l'hommage de cette étude, avec nos très sincères remerciements.

Nous prions également MM. Lebeau et Lutz, de croire à notre profonde reconnaissance pour avoir bien voulu nous faire l'honneur d'être de notre Jury.

Marcel BECQUET.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CONTRIBUTION

à l'étude de l'action du bacille bulgare

sur la flore intestinale

INTRODUCTION

ORIGINES DE LA BACTÉRIOTHÉRAPIE

Délaissant les anciennes méthodes souvent empiriques, la thérapeutique a évolué très rapidement, en ces dernières années, basant tous ses progrès sur l'admirable œuvre scientifique que nous légua Pasteur et qui ouvre, à l'art de guérir, tant de portes nouvelles.

Ce fut d'abord la vaccination, puis la sérothérapie ; enfin plus récemment encore, on vit éclore une autre méthode qui emploie comme auxiliaires thérapeutiques divers micro-organismes vivants qui doivent, par leur présence ou leurs sécrétions, lutter contre les microbes pathogènes ou simplement nuisibles au bon fonctionnement des organes du corps humain. Ce fut l'avènement de la Bactériothérapie.

L'idée cependant n'était pas nouvelle. Dès 1852, en effet, Mone, médecin anglais, préconisait l'emploi de la levure de bière comme médicament, mais cet essai fut abandonné. Repris par Debouzy, puis par Brocq, vers 1897, pour le traitement de la furonculose, des pyodermies, des acnés phlegmonneuses, sous le nom de Mycodermothérapie, l'emploi de la levure de bière fut même étendu au traitement du diabète, puis aussi de la gastro-entérite : c'était alors la première fois que l'on utilisait, en remplacement des antiseptiques intestinaux, une cellule vivante à laquelle on attribuait un

pouvoir phagocytaire, bactéricide et antitoxique dont on escomptait une action suffisamment énergique pour entraver le développement de la flore putréfiante de l'intestin. Mais devant les insuccès répétés obtenus par l'emploi de la levure de bière, alors utilisée comme rénovateur intestinal, ce mode de traitement fut peu à peu abandonné et, de nos jours, il n'est prescrit que rarement.

Néanmoins, à la suite des résultats peu probants et souvent contradictoires donnés par les antiseptiques chimiques, qui pourtant sont légion il fallut bien songer à lutter efficacement contre la flore intestinale alors reconnue comme étant très souvent la cause primordiale de nombre d'affections locales voire même générales.

Ce fut Metchnikoff (1) qui, en 1904, dans sa brochure « La Vieillesse » laissa entrevoir le premier la possibilité de lutter contre les fermentations intestinales nocives en ensemençant l'intestin avec une culture de bacilles lactiques. Puis, en 1907, dans ses « Essais optimistes » et dans son livre « Médicaments microbiens, Bactériothérapie, Vaccination et Sérothérapie », enfin, en 1908, dans son « Essais sur la Nature humaine », le même auteur condamne énergiquement la flore du tube digestif humain, l'accusant, outre les désordres locaux qui nuisent au bon fonctionnement de cet appareil, de vieillir prématurément l'organisme, grâce aux composés phénolés toxiques, formés dans l'intestin par les putréfactions microbiennes.

Il exprime alors l'espoir qu'en entravant, sinon en supprimant, ces fermentations nocives, on pourrait reculer très loin l'apparition des stigmates de la sénilité

(1) Metchnikoff, *La Vieillesse*.

Id., *Essais optimistes*.

Id., *Médicaments microbiens, Bactériothérapie, Vaccination et Sérothérapie*.

Id., *Essais sur la Nature humaine*.

et se mettre à l'abri de toutes les déchéances qui sont le cortège habituel de la vieillesse ; car, pour cet auteur, la vieillesse est une maladie infectieuse, chronique, qui se manifeste par une dégénérescence ou un affaiblissement de nos éléments nobles, dus aux produits sécrétés par notre flore intestinale ; il laisse cependant entrevoir qu'en mettant en lutte le bacille lactique avec les microbes, hôtes habituels de l'intestin, on peut combattre la putréfaction intestinale, éviter l'intoxication chronique de nos organes et par cela même, retarder l'envahissement des toxines et des poisons, causes déterminantes de l'affaiblissement de notre organisme et de la sénilité précoce. En effet, selon Metchnikoff, le ferment lactique doit triompher des bactéries putréfiantes dans la concurrence vitale qui s'établit entre ces dernières et le ferment qui, par son pouvoir acidogène très marqué, doit en arrêter la pullulation et par conséquent en annihiler en partie les manifestations toxiques.

Cependant à la suite de cette théorie pleine d'espoirs, bien des contradictions ont surgi. Appuyé par les travaux de Cohendy, de Rosenthal, de Berthelot et de Chazarain-Wetzel (1) qui ont affirmé l'acclimatation possible d'un ferment lactique dans la cavité intestinale de l'homme, le traitement préconisé par Metchnikoff eut cependant des détracteurs. Alors que certains convaincus voyaient dans le bacille lactique un précieux auxiliaire capable de lutter contre les infections consécutives

(1) Cohendy, *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 1906, tome 60, page 602.

Id., 1906, page 361.

Id., 1906, page 558.

Id., *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, page 978.

Id., 1909, page 407.

Rosenthal et Berthelot, *Société de Thérapeutique*, 15 avril 1908.

Rosenthal et Chazarain-Wetzel, *Société de Thérapeutique*, 9 juin 1909.

Id., 29 octobre 1909.

Rosenthal, *Société de Thérapeutique*, 9 mars 1910.

aux interventions chirurgicales et d'aider à la prophylaxie des maladies microbiennes, sans oublier son rôle essentiel dans les affections gastro-intestinales, d'autres auteurs affirmaient que la bactériothérapie lactique manquait absolument de base scientifique. Les uns (1) déclaraient alors que le bacille lactique ne pouvait traverser le tube digestif sans y succomber à cause de l'acidité prononcée du suc gastrique. D'autres ont affirmé que le ferment lactique, employé comme rénovateur intestinal, était absolument inactif, ce ferment n'apportant aucune atténuation à la virulence des matières fécales, et l'acidité qu'il développe n'entravant que partiellement la pullulation des microbes putréfiants. D'autres enfin (2) ont même été jusqu'à considérer ce traitement comme dangereux parce que capable de déterminer la production d'entérite subaiguë ou chronique.

Tel est actuellement l'état de la question, très controversée comme on voit.

Aussi avons-nous essayé de reprendre ici l'étude de ce traitement en tâchant d'élucider le véritable rôle que remplit le ferment lactique mis en présence des bactéries de l'intestin.

PLAN DES RECHERCHES

Nous nous sommes appliqué à étudier les différentes questions suivantes que nous avons groupées en deux chapitres.

1° Le bacille lactique traverse-t-il indemne le tube digestif ?

(1) E. Palier, de New-York, *Société de Thérapeutique*, 14 octobre 1908.

Id., 10 février 1909.

(2) G. Carrière, *Société de Thérapeutique*, 14 février 1912.

2° S'établit-il à demeure dans l'intestin en supplantant les autres espèces ?

3° Sous quelle forme l'absorption de ce ferment donne-t-elle les meilleurs résultats ?

Pouvant être étudiés dans la même série d'expériences, ces trois points se trouvent résolus dans le Chapitre I.

4° Le bacille lactique vivant en symbiose avec les microbes intestinaux apporte-t-il une atténuation à leur virulence ?

Les recherches nécessitées par cette dernière question forment à elles seules le Chapitre II.

Afin d'éliminer les nombreuses causes d'erreurs que ferait naître une expérimentation sur autrui, tous les essais relatés dans le premier chapitre de ce travail furent faits sur nous-même.

Mais avant d'aborder la série d'expériences devant servir de bases à nos conclusions, il nous a fallu rechercher un ferment lactique véritablement actif et toujours identique, nous permettant de travailler pour résoudre à coup sûr les questions exposées ci-dessus.

CHOIX DU FERMENT LACTIQUE

Parmi les nombreuses espèces de bacilles lactiques qui existent, il était nécessaire que nous choissions un ferment de forme bien définie, de culture facile, bon acidogène, et doué d'une faculté de reproduction intense de façon à en amener très rapidement la pullulation dans l'intestin.

Nous dûmes laisser de côté les *streptocoques* lactiques vulgaires, le *bacillus acidi paralactici*, et le *bacillus acidi bifidus*, formes peu résistantes et de culture assez délicate. Aussi notre choix s'est-il porté sur le

bacille bulgare véritable (bacille de Massol) déjà employé précédemment par plusieurs auteurs dans leurs recherches sur la bactériothérapie lactique (1). Ce ferment, en effet, en tant que lactique, est très résistant et remarquable par la grande quantité d'acide qu'il est susceptible de produire lorsque le milieu lui est favorable. Ce bacille semblait donc réunir toutes les conditions nécessaires pour servir utilement à notre expérimentation.

MORPHOLOGIE ET PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES DU BACILLE BULGARE

Le bacille bulgare est un très gros bacille, de 2 à 20 μ , poussant souvent en chaînes formées de plusieurs articles, ce qui lui donne un aspect se rapprochant beaucoup de celui du bacille charbonneux. Immobile, dépourvu de capsule, il est indifféremment aérobie ou anaérobie. Dans les cultures de plusieurs jours, on voit très souvent le protoplasma se condenser au milieu de chaque article, ce qui donne à ce bacille, lorsqu'il est en chaînes, l'apparence d'un gros streptocoque. Pous-sant très bien sur le lait, il le coagule en quinze heures environ avec production, aux dépens du lactose, d'une acidité très grande qui peut atteindre, après 10 jours d'étuve, à 37°, de 22 à 25 grammes d'acide lactique par litre (31 gr. 30, selon Cohendy (2)).

A 37° qui est sa température optima de culture, un bouillon peptoné, lactosé ordinaire, met de 18 à

(1) Cohendy, Rosenthal, Berthelot, Chazarain-Wetzel, *Société de Thérapeutique*, années 1908-1909-1910.

Comptes Rendus de la Société de Biologie, année 1906.

Annales de l'Institut Pasteur, années 1906-1909.

(2) Cohendy, *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 1906, page 364.

20 heures à se troubler. Le trouble est homogène, très légèrement moiré. Il ne forme pas de voile et ne produit aucun pigment.

La réaction du milieu est acide ; quant à l'odeur de la culture, elle est nulle au début, mais elle prend, au bout de quelques jours, celle du lait aigri. Ce bouillon d'ailleurs n'est pas son milieu électif, mais il y pousse bien quand même, trouvant dans le lactose l'élément nécessaire à son existence. Il pousse également sur un bouillon à base de saccharose ou de glucose en produisant la fermentation de ces sucres.

Néanmoins le milieu qui lui convient le mieux est assurément le lait, en ayant soin de faire des réensemencements très fréquents, tous les 2 jours environ, pour éviter que l'acidité produite ne vienne entraver ou même détruire la culture.

Le bacille bulgare peut être ingéré par l'homme, même à l'état de culture très concentrée, sans produire aucun désordre de l'économie.

Injectée dans les muscles d'un cobaye, la culture du même bacille en bouillon peptoné, lactosé, ne donne lieu à aucun trouble de l'organisme.

ACTION DES MATIÈRES COLORANTES ET DES DÉCOLORANTS SUR LE BACILLE BULGARE

Les matières colorantes simples agissent diversement sur le bacille bulgare. Alors que le bleu de méthylène, par exemple, ne le teinte que très lentement, il se colore beaucoup mieux par la fuchsine, la thionine ou le violet de méthyle auxquels il est utile d'ajouter de l'acide phénique comme mordant de façon à renforcer l'intensité de la coloration.

Le réactif qui nous a semblé être le colorant de choix est la fuchsine phéniquée de Ziehl.

Le bacille bulgare prend le Gram à condition toutefois que l'on ait prolongé suffisamment la coloration. Le décolorant qui nous a donné les meilleurs résultats est l'alcool-acétone.

La technique de la méthode de Gram qui reste classique lorsqu'on emploie le violet de méthyle, ou le violet de gentiane doit être légèrement modifiée lorsque le bacille bulgare est coloré par la fuchsine de Ziehl. En effet, en faisant agir la solution iodo-iodurée ordinaire sur cette matière colorante, l'alcool-acétone la dissout ensuite rapidement et le bacille est totalement décoloré ; aussi, est-il utile, pour obtenir de bonnes préparations, de modifier la formule de la liqueur de Gram, en préparant une solution bromo-bromurée au lieu d'une solution iodo-iodurée. En opérant dans ces conditions, le bacille bulgare reste coloré d'une façon intense par la fuchsine.

Enfin, il est à noter que le bacille bulgare coloré ne résiste ni à l'alcool, ni aux acides minéraux ou organiques même dilués à 1 %.

Après un mordantage énergique par l'acide chromique à 5 %, ce bacille ne se décolore que très peu par l'alcool-acétone ; c'est ainsi que dans les cultures de plusieurs jours nous avons pu voir les condensations protoplasmiques qui se produisent dans chaque segment des bacilles en chaînes, ces amas se trouvant colorés en rouge vif et le reste du microbe formant autour de ce point une sorte de gangue facilement visible et teintée en bleu pâle, après une seconde coloration par le bleu de méthylène.

On peut arriver au même résultat par la méthode de Gram mais avec moins de netteté.

ISOLEMENT DU BACILLE BULGARE

Désireux de n'employer que des cultures et préparations absolument sélectionnées, en tant qu'espèce de ferment lactique, nous nous sommes efforcé de rechercher et d'isoler ensuite le véritable bacille bulgare que nous destinions à notre expérimentation.

Après de nombreuses recherches, nous avons pris comme point de départ un produit commercial présenté sous forme de bouillon de culture concentré que l'examen microscopique nous avait révélé comme renfermant une grande quantité de bacilles bulgares vrais associés à des streptocoques lactiques ordinaires.

Voulant tout d'abord nous débarrasser des microbes autres que le ferment choisi, nous avonsensemencé un peu de ce bouillon sur un milieu lactosé afin de réveiller l'activité des ferments lactiques.

Après avoir fait trois réensemencements successifs, à trois jours de distance l'un de l'autre, nous avons obtenu une culture dont une goutte, examinée au microscope, laissait voir de très nombreux bacilles bulgares et quelques streptocoques lactiques.

Ces derniers, d'ailleurs, semblaient se raréfier dans les examens suivants, l'acidité légère du milieu devant entraver leur pullulation sans empêcher visiblement le développement du ferment bulgare, qui a toujours montré une vitalité beaucoup plus grande. Un dernier réensemencement nous a donné une culture presque pure du bacille choisi ; mais, néanmoins, pour agir avec toute l'exactitude désirable, nous avons tenté un isolement sur gélatine en boîte de Pétri.

N'ayant pas encore pris connaissance, à ce moment, des travaux de Cohendy (1), sur le bacille bulgare, il

(1) Cohendy, *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 1906, page 558.

nous était permis d'essayer cette technique tout à fait classique. Cet auteur, en effet, dans une description du bacille bulgare, dit que cette espèce ne donne pas de culture en gélatine sucrée. Ignorant cette particularité, nous avons, pour mener à bien notre isolement, suivi la méthode ordinaire.

Voici d'ailleurs notre mode opératoire : 10 gouttes de la dernière culture, renfermant une petite quantité de carbonate de chaux et vieille de 5 jours, ont été diluées dans 100 centimètres cubes d'eau stérilisée. 10 gouttes de cette dilution ont été mélangées au contenu stérilisé d'un tube de gélatine peptonée liquéfiée de formule suivante :

Peptone sèche.....	3.00
NaCl	0.50
Gélatine blanche	10.00
Eau distillée q. s. p.....	100.00

Cette gélatine fut ensuite coulée dans une boîte de Pétri stérilisée qui fut placée dans un endroit obscur. Au bout de 48 heures, les colonies étaient visibles, poussant peu nombreuses et bien distinctes les unes des autres, mais uniquement dans la partie aérobie. Douze heures après, les colonies ayant acquis un développement suffisant, nous avons prélevé une très faible partie de l'une d'entre elles avec le fil de platine et nous avons procédé à l'examen microscopique. Nous avons ainsi pu voir que cette colonie provenait réellement d'un bacille bulgare qui avait bien proliféré sur la gélatine peptonée quoique non sucrée. Pouvant alors agir avec certitude, nous avons prélevé une autre parcelle de cette même colonie avec les précautions d'usage, ce qui nous a permis d'ensemencer un bouillon lactosé, en attendant d'avoir déterminé par plusieurs essais le milieu de culture le plus propice au développement du bacille bulgare. Nous avons, dès lors, isolé notre ferment à l'état pur.

Cependant, parcourant ensuite les travaux de Cohendy relatifs à la bactériothérapie lactique, au cours de la bibliographie que nous avons dû établir avant de commencer nos essais, nous avons vu que cet auteur disait que le bacille bulgare ne poussait pas sur gélatine. Malgré toutes les raisons que nous avions de croire que notre ferment isolé était bien authentique, nous avons voulu nous assurer de son identité. Pour ce faire, M. le professeur Grimbert voulut bien mettre à notre disposition un échantillon véritable de bacille bulgare provenant du laboratoire de Metchnikoff. Cultivant séparément alors ce bacille authentique et le ferment que nous avions isolé, nous avons pu comparer de très près leur morphologie, leur action sur les milieux de culture habituels ainsi que leurs propriétés biochimiques respectives. Dans tous les cas, les deux bacilles donnèrent des réactions semblables. Leur aspect, leurs dimensions et leur arrangement étaient les mêmes. Leur action sur le lactose donnait, à quelques décigrammes près, une acidité équivalente dans les deux cas, et il n'est pas jusqu'aux condensations protoplasmiques que nous signalions plus haut, que nous pûmes voir avec le bacille bulgare authentique après quelques jours de culture sur un bouillon lactosé.

La préférence de chacun des deux ferments pour les milieux de culture a toujours été la même. Cependant nous avons étudié, en particulier et tout spécialement, leur action sur la gélatine nutritive puisque nous nous trouvions en contradiction avec l'auteur, M. Cohendy, qui étudia déjà cette question.

On a vu plus haut, comment nous avons pu isoler notre bacille sur ce milieu en boîte de Pétri. Aussi avons-nous recommencé cet essai avec le bacille bulgare authentique que nous avait remis M. le professeur Grimbert.

10 gouttes d'une culture de ce bacille sur bouillon

lactosé, additionnée de carbonate de chaux et vieille de cinq jours, furent diluées dans 100 centimètres cubes d'eau stérilisée et 5 gouttes de la dilution furent mélangées à un tube de gélatine de même formule que ci-dessus. Le tout versé dans une boîte de Pétri fut conservé à l'obscurité. Au bout de 4 jours, de rares colonies avaient fait leur apparition ; peu à peu, de nouvelles étaient visibles et 10 jours après la mise en expérience de cette culture, d'autres colonies ne faisaient encore que d'apparaître, mais toujours et seulement dans la partie aérobie. Toutes ces colonies étaient bien dues au développement du bacille bulgare, comme nous l'a démontré l'examen microscopique.

Il est à noter que si le ferment authentique a poussé moins vite sur gélatine que notre bacille isolé précédemment, nous croyons pouvoir l'attribuer à ce fait, que ce dernier a été cultivé au mois de juillet dans le laboratoire où la température variait entre 20° et 22°, tandis que l'essai fait sur le bacille bulgare authentique a été fait au mois de février dans le même appartement mais avec une température de 10° à 12°. De là, la différence entre le temps d'apparition des colonies dans les deux cas.

De plus et pour pouvoir affirmer ces faits, nous avons versé 2 gouttes de culture de bacille bulgare véritable dans un tube de gélatine liquéfiée. Après mélange, cette culture fut conservée à l'obscurité. La même préparation fut faite avec le bacille que nous avions isolé et les 2 tubes obtenus furent placés au même endroit dans les mêmes conditions de lumière et de température. Au bout de quatre jours (nous étions alors en hiver), chacun des 2 tubes présentait à la partie supérieure de la gélatine de très petites colonies peu visibles et isolées les unes des autres. Deux jours après, ces colonies étaient réunies et occupaient toute la surface de la gélatine. Au bout de 48 heures, il y

avait liquéfaction très légère à la surface des milieux de culture et la partie liquide examinée au microscope laissait voir de très nombreux bacilles bulgares toujours isolés, jamais en chaînes. Les jours suivants, la liquéfaction augmenta légèrement, les bacilles formant, entre la partie liquide et la partie restée solide, une sorte d'assise liquéfiante progressant excessivement lentement, sans que jamais, au cœur même de la gélatine restée inaltérée, aucun bacille n'ait révélé sa présence. La liquéfaction totale des tubes a demandé dans un cas 42 jours et dans l'autre 55 jours. De nombreux prélèvements faits sur les deux liquides surmontant la gélatine nous ont permis de voir qu'après 6 jours, le bacille avait l'air de se renfler, en présentant en son milieu des condensations protoplasmiques comme nous l'avons déjà signalé dans les cultures.

A la fin de la liquéfaction, le bacille n'affectait plus que la forme de masses arrondies, méconnaissables, mais qui, dans les deux cas, réensemencées sur un bouillon lactosé, additionné de carbonale de chaux, ont redonné des cultures très caractéristiques et identiques pour les deux tubes.

Enfin, pour compléter ces recherches, nous avons tenté avec l'un et l'autre de ces deux bacilles, des ensemencements par piqûre sur gélatine. Ces cultures ont réussi également, mais elles ont été très longues à se révéler : l'une a demandé 10 jours et l'autre 12 jours pour être visible. Nous ajouterons que ces cultures n'ont pas eu lieu en profondeur mais uniquement en surface, à l'endroit même où le fil de platine pénétra dans la gélatine au moment de l'ensemencement.

En résumé, nous pouvons conclure que les deux bacilles sont identiquement semblables. Et nous pouvons ajouter que, contrairement à ce qu'avait avancé Cohendy, le bacille bulgare est susceptible de pousser sur gélatine, même non sucrée, dans certaines conditions et toujours dans la partie aérobie du milieu

qui lui est offert. La non-réussite des cultures en profondëur par piqûre sur gélatine vient corroborer ce fait déjà suffisamment prouvé par le succès des cultures en tubes et en boîtes de Pétri.

Alors que l'authenticité de notre bacille isolé était bien démontrée, il nous fallait encore, pour assurer la conservation de l'espèce, lui trouver un terrain favorable.

CHOIX DU BOUILLON DE CULTURE

Comme milieu électif, on pouvait certes utiliser le lait, et nous l'avons employé d'ailleurs, comme l'on pourra s'en rendre compte au cours de notre expérimentation ; mais ce milieu ne présentant qu'une alcalinité absolument nulle, au bout de quelques heures de culture, et, grâce à l'acide lactique fabriqué par le ferment bulgare aux dépens du lactose, il se produit une coagulation des matières albuminoïdes, ce qui donne une masse tout à fait hétérogène se prêtant très mal à des réensemencements qui nécessairement doivent être très fréquents. En effet, pour conserver l'espèce choisie et isolée, pour pouvoir en faire des cultures successives, sans affaiblir sa vitalité, et partant de là, son pouvoir acidogène, qu'il était précieux de maintenir intégral, il nous fallait offrir au ferment bulgare un terrain qui, tout en étant très propice à son développement, ne subissait pas de modifications profondes dans sa constitution, même après plusieurs jours de culture à l'étuve.

Un bouillon végétal lactosé, de préparation très simple, est celui qui nous a donné les meilleurs résultats, l'emportant de beaucoup sur les bouillons peptonés habituellement utilisés en bactériologie.

Nous nous sommes donc arrêté à la formule suivante qui d'ailleurs n'est autre que celle du milieu de Bertrand : 100 grammes de touraillons d'orge sont maintenus à 50° pendant une heure dans 1.000 centimètres cubes d'eau distillée ; puis ensuite on porte le tout à l'ébullition ; on ajoute enfin 40 grammes de lactose et 10 grammes de peptone ; après filtration, on complète le volume à un litre et on stérilise à 115° pendant 5 minutes. On divise alors ce bouillon en flacons de 100 centimètres cubes et dans chacun d'eux on ajoute un gramme de carbonate de calcium pur de façon à saturer, au fur et à mesure de sa production, l'acidité engendrée par la culture du bacille lactique. Cette acidité entraverait, en effet, au bout de quelques jours, le développement normal du ferment bulgare. Les flacons ainsi préparés et soigneusement obturés à l'ouate sont enfin stérilisés à 115° pendant 20 minutes.

TEMPÉRATURE DE CULTURE

Tous nos essais devant porter sur les résultats de l'ingestion de cultures ou de produits renfermant des ferments bulgares vivants, dans l'espoir de voir ce micro-organisme s'acclimater, puis s'établir à demeure dans l'intestin, nos efforts ont tendu à toujours lui offrir une température voisine de celle de cet organe, de façon à ce que l'évolution de l'espèce se fasse toujours au même degré tant *in vivo* que *in vitro*. La température normale de l'intestin variant, suivant les stades de la digestion, entre 37°2 et 37°6, nous avons adopté pour toutes nos cultures à l'étuve la température uniforme de 37°5. A ce degré, le développement de notre ferment s'est toujours fait très régulièrement.

Avant d'aborder notre expérimentation et alors que nous avons choisi et isolé le ferment devant servir à nos essais, que nous avons appris à le cultiver et à le colorer, il nous fallait encore pouvoir le reconnaître facilement au microscope au milieu des autres microbes que l'on rencontre en nombre considérable dans les déjections.

Aussi nous sommes-nous appliqué tout d'abord à faire des colorations simples en opérant sur des échantillons provenant d'une culture pure, afin de nous entraîner à bien reconnaître notre bacille. Puis nous avons mélangé quelques gouttes d'une culture dans un peu d'eau stérilisée contenant des traces de matières fécales de façon à nous habituer à retrouver facilement le bacille bulgare parmi les très nombreux micro-organismes, hôtes de l'intestin.

Après des tentatives successives il nous fut certes possible d'y arriver, mais n'ayant recours qu'à une coloration simple et devant la multitude des bactéries intestinales, nous eûmes quelquefois des préparations où le doute était permis avant d'affirmer la présence certaine du bacille bulgare. Aussi nous avons cru préférable d'employer la méthode de Gram qui nous a facilité nos recherches en nous permettant de distinguer de suite notre bacille parmi les autres espèces si nombreuses. Après de nombreux essais semblables, et alors que nous croyions être suffisamment exercé à ce genre de recherches, nous avons commencé nos expériences.

CHAPITRE PREMIER

Cette partie de notre travail consistant à ingérer du ferment bulgare sous différentes formes et à le rechercher ensuite dans les déjections afin de savoir s'il ressort vivant du tube digestif, et s'il s'acclimata dans l'intestin, nous donnons ci-dessous le *modus operandi* que nous avons adopté pour obtenir les préparations destinées à l'examen microscopique.

PRÉLÈVEMENT DES MATIÈRES FÉCALES

Les matières fécales ont toujours été recueillies à la première selle du matin, aussi aseptiquement que possible et enfermées aussitôt dans une boîte de Pétri. Chaque fois, à l'aide d'une spatule, nous avons prélevé sur la masse un échantillon total de 1 gramme, mais en ayant soin qu'il soit formé de parties provenant tant de la surface que du milieu de l'échantillon. Nous avons broyé ensuite ce prélèvement de 1 gramme dans un mortier avec 10 centimètres cubes d'eau, dont une goutte, déposée sur une lame de verre, fut étendue par frottis à l'aide d'une autre lame. Toutes nos prises d'essai ont été faites dans ces conditions, dans les mêmes proportions, de façon à toujours avoir des résultats comparables entre eux.

Fixation

Après séchage à l'air libre, la préparation a été fixée par la chaleur en la passant à 3 reprises successives dans la flamme d'un bec Bunsen.

Coloration

Après refroidissement, nous avons procédé à la coloration :

- 1° Coloration par la fuchsine phéniquée de Ziehl pendant 5 minutes, à chaud ;
- 2° Action de la liqueur de Gram modifiée (1) pendant une minute sur la préparation non lavée ;
- 3° Décoloration par l'alcool-acétone ;
- 4° Recoloration par le bleu de méthylène.

Dans ces conditions, le bacille bulgare est coloré en rouge vif ainsi que quelques autres microbes qui prennent le Gram (surtout des cocci, très rarement des formes longues) tous les autres microbes sont teints en bleu.

Il est toujours très facile, après cette coloration, de reconnaître le bacille bulgare, surtout avec un peu d'entraînement.

En employant la méthode de Gram classique, c'est-à-dire coloration par le violet phéniqué, nous avons obtenu des préparations plus ternes sur lesquelles le bacille bulgare ne ressortait pas avec assez d'intensité ; c'est pourquoi nous avons cru devoir modifier légèrement cette technique en colorant tout d'abord par la fuchsine de Ziehl, mais en ayant soin de faire agir ensuite la liqueur de Gram bromo-bromurée, comme nous l'avons exposé précédemment.

La recherche de notre ferment par cette méthode est donc relativement facile.

(1) Solution bromo-bromurée.

Dans les cas où un premier examen nous a donné un résultat négatif, nous avons fait une seconde préparation et en cas d'insuccès répété, une troisième préparation. Si dans cette dernière, il n'y avait pas encore trace du bacille cherché, seulement alors nous avons conclu à néant.

ÉVALUATION DU NOMBRE DES BACILLES BULGARES ÉLIMINÉS PAR RAPPORT AUX AUTRES MICROBES

En plus de la présence du bacille bulgare dans les fèces, il fallait encore nous assurer de la faculté qu'on attribue à ce bacille d'arriver à supplanter les autres espèces de la flore intestinale. Pour vérifier ce fait, nous avons essayé de faire une numération de microbes à l'examen microscopique de chaque préparation, en comptant les bacilles bulgares d'abord, puis tous les autres ensuite en bloc.

L'opération eût été assez délicate au point de vue de l'exactitude si nous n'avions pas eu recours à un oculaire quadrillé qui nous a permis de prendre des points de repère pour arriver à une numération approximative. Le champ du microscope ne permettait pas en effet de compter un grand nombre de microbes avec la sécurité absolue de ne pas en oublier ou de ne pas compter deux fois les mêmes ; aussi avec cet oculaire quadrillé dont le tracé se superposait en image à la préparation, nous avons obtenu, à chaque examen microscopique un champ d'observation divisé en carrés dont quatre complets. A l'aide de ce dispositif, nous avons pu compter d'abord les bacilles bulgares d'un carré, puis les autres microbes, en opérant de même pour les trois

autres carrés visibles, et en répétant la même numération à dix endroits différents pour chaque préparation.

Les chiffres obtenus par ce procédé ont été consignés en regard de chaque examen microscopique, le nombre des bacilles bulgares trouvés étant rapporté à 100 microbes totaux.

Nous donnons ci-dessous un exemple de la numération que nous avons effectuée sur une préparation en le faisant suivre des calculs permettant d'établir la proportion X de bacilles bulgares pour 100 microbes rencontrés.

Différentes observations faites sur la même préparation	Carré n° 1		Carré n° 2		Carré n° 3		Carré n° 4	
	Nombre de B. bulgares	Nombre de microbes totaux	Nombre de B. bulgares	Nombre de microbes totaux	Nombre de B. bulgares	Nombre de microbes totaux	Nombre de B. bulgares	Nombre de microbes totaux
1	1	24	0	53	0	28	1	38
2	1	39	0	24	1	50	1	20
3	1	57	1	48	0	29	0	44
4	0	59	0	60	1	37	0	53
5	0	52	0	47	0	55	1	29
6	0	31	0	52	1	50	0	22
7	0	37	1	55	1	30	1	53
8	0	43	0	33	0	35	1	15
9	0	38	1	44	1	27	0	29
10	1	37	0	25	1	47	0	52
Totaux	4	417	3	441	6	388	5	385

En additionnant le nombre de bacilles bulgares rencontrés dans les quatre carrés des dix examens microscopiques, on a :

$$4 + 3 + 6 + 5 = 18$$

En opérant de même pour les microbes totaux, on obtient :

$$417 + 441 + 388 + 385 = 1.631$$

soit 18 bacilles bulgares pour 1.631 microbes totaux.

Il ne reste plus qu'à établir la proportion X pour 100 d'après l'équation :

$$\frac{18 \times 100}{1.631} = 1,10$$

Le résultat obtenu 1,10 signifie donc que dans la préparation examinée il existait 1,10 bacilles bulgares pour 100 microbes quelconques.

La dilution à 1/10^e des matières fécales peut paraître trop concentrée pour un examen microscopique suivi d'un essai de numération de microbes ; mais les dilutions plus étendues nous ont donné de mauvais résultats et malgré l'imperfection de notre méthode, les chiffres que nous avons obtenus conservent leur valeur puisqu'ayant toujours opéré dans les mêmes conditions, ces résultats demeurent comparables.

Nous n'avons d'ailleurs pas eu la prétention, en opérant ainsi, de faire une véritable numération, mais d'établir tout au moins un rapport permettant de nous rendre compte si le bacille bulgare est capable de se substituer aux autres espèces microbiennes dans l'intestin de l'homme.

EXPÉRIMENTATION

En possession des moyens propres à reconnaître sûrement le bacille bulgare, nous avons commencé nos expériences.

L'absorption du ferment étant faite habituellement sous 3 formes : lait caillé, bouillon de culture et comprimés, nos recherches ont porté successivement sur le résultat de l'ingestion de notre bacille dans ces différents milieux.

Nous avons donc divisé nos essais en trois groupes,

selon que les expériences portaient sur l'une ou l'autre forme d'absorption du ferment ; chaque groupe lui-même fut à son tour réparti en deux séries : la première, série A, correspond dans chaque groupe aux prises de bacille bulgare, avec le régime alimentaire normal de l'adulte ; tandis que la seconde, série B, fut toujours accompagnée du régime lacto-féculent sucré préconisé dans les entérites chroniques et les auto-intoxications d'origine intestinale.

Nous pouvions ainsi, en nous astreignant à suivre successivement ces deux régimes, nous rendre compte si le bacille bulgare pouvait être soumis impunément à l'acidité du suc gastrique, et voir son développement était favorisé par l'abstention de toute alimentation carnée. Chaque série d'essais a duré 15 jours pendant lesquels nous avons absorbé notre ferment sous la forme choisie. La recherche dans les fèces n'a commencé que le lendemain de la première prise de bacille bulgare.

Pour compléter le détail de nos recherches, nous indiquons ci-dessous, et dans les différentes séries, le régime, la quantité de lait, de bouillon ou de comprimés absorbés et nous avons noté chaque jour les résultats de la recherche du bacille bulgare ainsi que la proportion X de ce bacille pour 100 autres microbes rencontrés.

1° Essais faits avec le lait caillé

Nous nous sommes tout d'abord procuré du lait de bonne qualité qu'une analyse détaillée de ses éléments nous a indiqué comme étant très normal. Livré frais, tous les jours, ce lait fut chaque fois porté à l'ébullition pendant 10 minutes. Divisé alors en deux doses, puisensemencé de bacille bulgare, il fut maintenu à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures. Au bout de ce temps, le lait était toujours très bien caillé et montrait à l'examen microscopique une quantité très grande de

ferments bulgares. La préparation a donc toujours été faite la veille du jour où elle devait être absorbée.

Série A.

Régime ordinaire, 500 grammes de lait caillé pris en deux fois entre les repas.

Jours d'essai	Aspect des fèces	Proportion de bacille bulgare pour 100 microbes
1	Couleur normale	0,40 pour cent
2	Id.	0,69 " "
3	Id.	1,70 " "
4	Id.	2,40 " "
5	Id.	2,00 " "
6	Id.	1,70 " "
7	Couleur tirant sur le jaune	1,44 " "
8	Couleur jaune	2,10 " "
9	Id.	1,70 " "
10	Id.	1,20 " "
11	Id.	0,66 " "
12	Id.	0,71 " "
13	Id.	0,89 " "
14	Id.	1,32 " "
15	Id.	1,39 " "

Après la dernière prise d'essai, nous avons encore pu retrouver le bacille bulgare dans les déjections pendant 6 jours. Pendant toute la durée de ces essais, la réaction des fèces est restée neutre. Quant au changement d'aspect il s'est opéré progressivement.

Série B.

Régime féculent et sucré, 500 grammes de lait caillé pris en deux fois entre les repas.

Jours d'essai	Aspect des fèces	Proportion de bacille bulgare pour 100 microbes
1	Couleur normale	0,00 pour cent
2	Id.	0,00 " "
3	Id.	0,76 " "
4	Id.	0,93 " "
5	Id.	1,03 " "
6	Id.	1,44 " "
7	Id.	0,85 " "
8	Couleur plus claire	1,14 " "
9	Id.	0,65 " "
10	Couleur jaune	1,86 " "
11	Légère diarrhée couleur jaune	1,72 " "
12	Id.	2,84 " "
13	Id.	0,73 " "
14	Id.	0,96 " "
15	Id.	1,44 " "

Après la dernière prise d'essai, nous avons encore pu retrouver le bacille bulgare dans les déjections pendant huit jours. Pendant toute la durée de ces essais, la réaction des fèces est restée neutre. Quant au changement d'aspect, il s'est opéré progressivement.

2° Essais faits avec le bouillon de culture

Voulant employer un produit plus riche en bacilles que le lait caillé, nous avons eu recours au bouillon de culture. Celui que nous avons utilisé est le bouillon végétal lactosé que nous avons décrit plus haut, ensemencé depuis trois jours et maintenu à l'étuve pendant ce temps.

Les cultures vieilles de trois jours sont en effet très

chargées en ferments bulgares, comme nous l'a démontré l'examen microscopique. Le bacille y est en pleine activité et sa vitalité n'est pas encore ralentie comme dans les cultures de sept à huit jours qui ne sont guère plus riches en ferments. Ce produit semblait donc nous donner une garantie suffisamment sérieuse pour pouvoir entreprendre nos essais avec fruit.

Série A.

Régime ordinaire, 100 centimètres cubes de bouillon de culture pris en deux fois entre les repas.

Jours l'essai	Aspect des fèces	Proportion de bacille bulgare pour 100 microbes
1	Couleur normale	0,00 pour cent
2	Id.	0,65 " "
3	Couleur plus claire	1,19 " "
4	Couleur jaune	2,14 " "
5	Id.	1,86 " "
6	Id.	1,03 " "
7	Id.	2,82 " "
8	Id.	2,98 " "
9	Id.	2,50 " "
10	Id.	3,18 " "
11	Id.	3,70 " "
12	Id.	3,50 " "
13	Id.	3,25 " "
14	Id.	3,20 " "
15	Id.	3,17 " "

Après la dernière prise d'essai, nous avons encore pu retrouver le bacille bulgare dans les déjections pendant 10 jours. Pendant toute la durée de ces essais, la réaction des fèces est restée neutre. Quant au changement d'aspect, il s'est opéré très rapidement dès le quatrième jour.

Série B.

Régime féculent et sucré, 100 centimètres cubes de bouillon de culture pris en deux fois entre les repas.

Jours d'essai	Aspect des fèces	Proportion de bacille bulgare pour 100 microbes
1	Couleur normale	0,29 pour cent
2	Id.	0,13 " "
3	Id.	0,10 " "
4	Id.	0,70 " "
5	Id.	0,72 " "
6	Couleur jaune par places	2,24 " "
7	Couleur jaune	1,09 " "
8	Id.	2,70 " "
9	Id.	0,83 " "
10	Id.	2,43 " "
11	Id.	0,74 " "
12	Id.	1,24 " "
13	Id.	1,39 " "
14	Id.	0,81 " "
15	Id.	0,84 " "

Après la dernière prise d'essai, nous avons encore pu retrouver le bacille bulgare dans les déjections pendant 9 jours. Pendant toute la durée de ces essais, la réaction des fèces est restée neutre. Quant au changement d'aspect, il s'est opéré progressivement.

3° Essais faits avec les comprimés

Il ne nous restait donc plus à faire que les essais avec les comprimés, forme sous laquelle le traitement bactériothérapique lactique est aujourd'hui le plus préconisé tant pour la facilité de son emploi que par son volume réduit.

Bien que l'on trouve dans le commerce des comprimés de véritable bacille bulgare, nous avons préféré, pour donner toute l'exactitude désirable à nos recherches, préparer nous-même notre produit.

Nous avons cultivé, à cet effet, pendant quinze jours, un ensemencement en bouillon, additionné de carbonate de chaux, de façon à ce qu'il soit excessivement riche en ferments. Puis nous avons incorporé cette culture à du lactose en poudre préalablement stérilisé, de façon à obtenir une pâte ferme. La masse a été alors desséchée très lentement à l'étuve à 36°.

Nous avons ensuite pulvérisé le tout, puis nous lui avons donné sa forme médicamenteuse. Chaque comprimé du poids de 0 gr. 50 correspondait à environ 0 gr. 20 de bouillon de culture concentrée et équivalait approximativement à 2 gr. 40 de bouillon de culture ordinaire. Lorsque nos comprimés furent terminés, nous avons cru bon de nous assurer de la vitalité du ferment qu'ils renfermaient, en faisant des ensemencements : nos essais réussirent à chaque fois.

Série A.

Régime ordinaire, 9 comprimés par jour pris en trois fois entre les repas.

Jours d'essai	Aspect des fèces	Proportion de bacille bulgare pour 100 microbes
1	Couleur normale	0,00 pour cent
2	Id.	0,00 " "
3	Id.	0,36 " "
4	Id.	0,58 " "
5	Id.	0,48 " "
6	Id.	0,69 " "
7	Id.	0,28 " "
8	Couleur jaune par places	0,79 " "
9	Diarrhée couleur jaune	1,30 " "
10	Id.	0,93 " "
11	Diarrhée intense couleur jaune	0,70 " "
12	Id.	2,02 " "
13	Id.	0,36 " "
14	Id.	0,75 " "
15	Id.	0,12 " "

Après la dernière prise d'essai, nous avons encore pu retrouver le bacille bulgare dans les déjections pendant cinq jours. Le cinquième jour, diarrhée intense. Pendant toute la durée de ces essais, la réaction des fèces est restée neutre. Quant au changement d'aspect, il s'est opéré progressivement.

Série B.

Régime féculent et sucré, 9 comprimés par jour pris en trois fois entre les repas.

Jours d'essai	Aspect des fèces	Proportion de bacille bulgare pour 100 microbes
1	Couleur normale	0,00 pour cent
2	Id.	0,00 " "
3	Id.	0,41 " "
4	Couleur plus claire	0,31 " "
5	Couleur jaune	0,36 " "
6	Id.	1,46 " "
7	Id.	1,53 " "
8	Id.	0,56 " "
9	Id.	0,68 " "
10	Id.	1,44 " "
11	Id.	0,64 " "
12	Couleur jaune, selles molles	1,10 " "
13	Id.	0,96 " "
14	Id.	1,64 " "
15	Id.	0,88 " "

Après la dernière prise d'essai, nous avons encore pu retrouver le bacille bulgare dans les déjections pendant sept jours. Pendant toute la durée de ces essais, la réaction des fèces est restée neutre. Quant au changement d'aspect, il s'est opéré progressivement.

Nous avons donc, à la suite de ces différentes séries d'expériences, terminé une partie de nos recherches.

Ne retenant pour l'instant qu'un seul fait, maintenant prouvé : à savoir que le bacille bulgare traverse indemne le tube digestif de l'homme, il nous restait encore à voir si ce micro-organisme est susceptible de remplir un rôle quelconque vis-à-vis des divers microbes qu'il rencontre dans l'intestin. C'est ce que nous allons étudier dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

A la suite des travaux de Tissier (1), Tissier et Martelly (2), Jacobson (3) et Metchnikoff (4) sur les microbes intestinaux, il est indiscutable que ces micro-organismes jouent un rôle prépondérant dans l'étiologie et la pathogénie de nombreuses maladies. En dehors des infections consécutives aux lésions accidentelles de la paroi intestinale, qui occasionnent la contamination de la cavité péritonéale, il faut bien reconnaître que la pullulation de certaines espèces microbiennes à l'intérieur même de l'intestin est susceptible de provoquer de graves désordres organiques : lésions locales tout d'abord, s'accompagnant quelquefois de perforations, et plus souvent encore de troubles généraux, plus ou moins accentués, produits tout au moins par les sécrétions nocives des microbes résorbées par les villosités intestinales et déversées dans la lymphe, sinon par le passage de ces microbes eux-mêmes au travers des cellules de l'intestin et leur migration dans l'organisme tout entier.

(1) Tissier, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1905, page 109. Microbes de l'intestin des nourrissons.

Tissier, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, page 273.

Tissier, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908, page 189. Flore intestinale des enfants.

(2) Tissier et Martelly, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, page 865. Putréfaction de la viande de boucherie.

(3) Jacobson, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908, page 300. Flore normale des nourrissons.

(4) Metchnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908, page 929. Etudes sur la Flore intestinale.

Metchnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1910, page 755. Etudes sur la Flore intestinale.

Laissant de côté ce dernier fait, c'est-à-dire le passage possible de certains micro-organismes à travers la paroi intestinale, théorie émise par Nocard et ses élèves (1), mais qui fut ensuite combattue par Opitz (2), nous ne retiendrons ici que la pullulation microbienne des voies digestives, l'action locale nuisible qu'exerce la flore intestinale ainsi que la nocuité de ses produits de sécrétion susceptibles d'être déversés dans la lymphe puis dans le sang au moment de l'absorption intestinale.

Il est en effet bien prouvé aujourd'hui que c'est par ce mécanisme que prennent naissance de nombreuses auto-intoxications. Comme cause déterminante de ces troubles et parmi les innombrables microbes intestinaux, il faut incriminer tout d'abord, selon Metchnikoff (3), les bactéries protéolytiques qui vivent en saprophytes dans la partie inférieure du tube digestif de l'homme. Ces bactéries rencontrent, en effet, dans l'intestin, un terrain tout préparé et les conditions les meilleures pour s'y développer : matières organiques, absence d'oxygène et température de 37°, tout semble être réuni pour faciliter leur pullulation. A l'encontre du *proteus* qu'on ne rencontre pas toujours dans l'intestin humain, ces bactéries s'y retrouvent constamment et leur présence habituelle dans les matières fécales est maintenant un fait acquis.

C'est donc à la suite de leur développement exagéré que ces microbes sont susceptibles d'occasionner les désordres que nous avons mentionnés plus haut : soit par leur pouvoir toxigène propre, soit en provoquant la putréfaction des matières albuminoïdes. C'est là vraisemblablement la cause initiale des troubles divers qui accompagnent très souvent les gastro-entérites.

(1) *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1895, pages 104, 344.

(2) *Zeitschrift, f. Hygiène*, 1898, tome xxiv, page 505.

(3) Metchnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908, page 929, *Etudes sur la Flore intestinale*.

C'est précisément pour essayer d'empêcher la formation de ces divers poisons que fut préconisée la bactériothérapie lactique et en particulier le traitement à base de ferment bulgare.

Les bactéries protéolytiques ne peuvent en effet se développer qu'en milieu alcalin, réaction normale de l'intestin. En modifiant cette réaction, en la rendant légèrement acide, on a espéré pouvoir entraver en partie le développement de la flore putréfiante.

Depuis longtemps déjà, l'acide lactique lui-même était prescrit dans les cas de diarrhées et surtout de gastro-entérites infantiles dans le but de combattre l'accroissement exagéré du nombre des microbes de l'intestin, cause directe de ces affections. Mais par le traitement à base de ferment lactique on a espéré plus : l'acide lactique en effet devant prendre naissance au sein même de la région infectée, on a escompté une action plus énergique et un résultat plus marqué. De plus, en attribuant au ferment bulgare un pouvoir antiseptique et anti-putride, en outre de ses propriétés acidogènes, on a entrevu comme réalisable la désinfection possible de la cavité intestinale de l'homme.

Cette désinfection est réelle ; en effet, à la suite des travaux de nombreux auteurs parmi lesquels Cohendy (1), il est indéniable qu'à la suite du traitement au bacille bulgare, la proportion de sulfo-éthers contenus dans l'urine s'abaisse notablement, preuve évidente de la diminution des fermentations intestinales. Cependant, bien que reconnaissant la désinfection de la partie inférieure du tube digestif comme possible, grâce au ferment bulgare, aucun auteur jusqu'à présent n'a précisé par quel mécanisme pouvait s'accomplir cette fonction.

(1) Cohendy, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 17 mars 1906.

L'acide lactique formé est-il susceptible de la réaliser tout seul ?

Le bacille bulgare, considéré comme ayant une sécrétion qui lui est propre, utilise-t-il cette propriété pour aider l'action de l'acide lactique, ou cette seule sécrétion suffit-elle pour parachever la désinfection intestinale ?

Problème très ardu comme on voit et que, seule, l'expérimentation pouvait permettre d'aborder.

Nous avons donc essayé sinon de le résoudre, tout au moins de délimiter l'action réputée bienfaisante du bacille bulgare en faisant notre possible pour élucider la façon dont elle peut s'exercer.

Le bacille bulgare vivant en symbiose avec les microbes intestinaux apporte-t-il une atténuation à leur virulence ? A quelle fonction de ce bacille faut-il attribuer le résultat possible ?

Nous ne pouvions songer, dans ces essais, à recourir à des microbes intestinaux isolés directement des matières fécales. En effet, la flore intestinale est très variable avec chaque sujet et nous n'aurions pu tirer de cette partie de notre travail, un résultat intéressant d'ordre général. Nous ne devons donc opérer que sur des espèces rencontrées presque toujours dans notre intestin, espèces parfaitement déterminées et en cultures pures. Après les travaux de Metchnikoff sur les microbes intestinaux, nous avons le choix, parmi les bactéries protéolytiques pouvant servir utilement à notre expérimentation, entre le *bacillus putrificus*, le *bacillus sporogenes* et le *bacillus Welchii*, espèces décrites pré-

cédemment par divers auteurs. Ces trois bactéries sont capables d'attaquer les matières albuminoïdes en donnant naissance, tant *in-vitro* que *in-vivo*, à des produits toxiques, résultat de la putréfaction qu'elles provoquent.

De ces trois espèces nous avons choisi le *bacillus putrificus* que l'on rencontre fréquemment dans le contenu intestinal, surtout dans les gastro-entérites graves ainsi que dans de très nombreux cas de péritonite et d'appendicite comme l'ont signalé plusieurs auteurs.

Nous pouvions donc voir en ce bacille et grâce à son rôle putréfiant un microbe suffisamment pathogène pour lui opposer le bacille bulgare et nous rendre compte si ce dernier, considéré comme rénovateur intestinal, était capable d'entraver le développement du *bacillus putrificus*, d'empêcher ses fonctions putréfiantes et d'amoindrir sinon de détruire les sécrétions toxiques qu'il est susceptible d'élaborer.

ETUDE SUCCINCTE DU “ BACILLUS PUTRIFICUS ”

Le *bacillus putrificus* étudié par Bienstock (1), Tissier et Martelly (2) ainsi que par Metchnikoff (3), Rodella (4) et Korentchewsky (5), est un bacille assez gros

(1) Bienstock, *Bacillus putrificus*, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, page 407.

(2) Tissier et Martelly, Putréfaction de la viande de boucherie, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, page 865.

(3) Metchnikoff, Etudes sur la Flore intestinale, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908, page 929.

(4) Rodella, Différenciation du *bacillus putrificus*, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1905, page 803.

(5) Korentchewsky, Etude biologique du *perfringens* et du *putrificus*, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909, page 91.

qui se présente dans les cultures sous trois aspects : forme simple de bacille tout d'abord, forme sporulée ressemblant à des baguettes de tambour, ce qui l'a fait comparer au bacille du tétanos, et enfin spores elles-mêmes, mises en liberté, qui constituent la forme de résistance de l'espèce. Ce bacille attaque de préférence les matières albuminoïdes aux dépens desquelles il vit en dégageant une odeur nauséabonde caractéristique et en sécrétant à la longue un pigment noir que l'on retrouve dans les cultures. Il pousse bien sur les milieux liquides habituels à condition toutefois qu'on lui fournisse les substances albuminoïdes indispensables à son développement : en l'espèce, viande hachée ou blanc d'œuf cuit. Dans le lait, il s'attaque à la caséine sans coaguler la culture. Il ne fait pas fermenter les sucres et est anaérobie. Il prend le Gram et se colore bien par les diverses matières colorantes habituellement employées. Les spores sont facilement mises en évidence par les méthodes classiques. Pour terminer, nous insistons sur ce fait que ce bacille, à l'encontre du *bacillus parapatrificus* que Passini (1) a tenté d'identifier avec lui, donne toujours lieu à une putréfaction marquée des albuminoïdes et ne donne jamais de culture aux dépens des matières sucrées.

Le *bacillus putrificus* que nous avons employé nous a été remis par M. le professeur Grimbart et provenait de l'Institut Pasteur.

Nos recherches devant porter sur des cultures simples et en symbiose de ce bacille avec le ferment bulgare, il nous fallait rechercher un milieu qui offre à la fois, dans sa composition, les éléments indispensables au développement de ces deux espèces.

(1) Passini, Zeitschrift, f. hygiène, 1905, volume XLIX, page 135.

FORMULE DU BOUILLON DE CULTURE

Devant offrir des matières albuminoïdes au *bacillus putrificus* et des sucres au ferment bulgare, nous nous sommes arrêté après quelques tâtonnements à la composition suivante : 500 grammes de viande fraîche de bœuf, débarrassée des graisses, des aponévroses et des tendons, ont été hachées et maintenues pendant 5 heures en macération dans un litre d'eau froide. Au bout de ce temps le bouillon obtenu a été cuit à feu doux puis porté à l'ébullition pendant 10 minutes. La masse exprimée, le liquide a été filtré sur un papier mouillé et on y a ajouté :

Peptone de viande.....	10 grammes
Sel marin.....	5 grammes
Lactose.....	40 grammes

Après une nouvelle ébullition, le bouillon a été neutralisé à la soude jusqu'à réaction très légèrement alcaline et le volume ramené à 1 litre. Après filtration, le bouillon a été divisé en flacons de 100 centimètres cubes. Dans chacun d'eux nous avons ajouté 5 grammes de blanc d'œuf cuit et nous les avons soigneusement obturés avec de l'ouate. Les flacons ainsi préparés furent enfin stérilisés à 120° pendant 20 minutes.

Le milieu de culture employé est en somme un bouillon de viande peptoné ordinaire auquel nous avons ajouté du lactose et du blanc d'œuf. Ainsi constitué, il semblait réunir tous les éléments nécessaires au développement consécutif ou simultané des deux bacilles que nous devons employer.

ESSAI DU BOUILLON DE CULTURE

Avant d'entreprendre nos recherches, nous nous sommes appliqué à voir si notre bouillon ainsi préparé réunissait toutes les conditions désirables pour le développement en culture anaérobie du *bacillus putrificus* et du bacille bulgare.

Un flacon de ce bouillon fut d'abord ensemencé avec du bacille bulgare : au bout de trente-six heures, le milieu de culture était absolument trouble et renfermait de nombreux ferments. Le même essai fut fait avec le *bacillus putrificus* en milieu anaérobie. Au bout de même temps le bouillon était complètement troublé, et l'examen microscopique nous y a révélé la présence de nombreux bacilles. Ce n'est que le troisième jour que l'on pouvait voir qu'il y avait attaque évidente du blanc d'œuf.

Nous avons donc là un milieu de culture en tous points propice au développement des deux espèces sur lesquelles devait porter notre expérimentation.

Toutes nos cultures de *bacillus putrificus* furent faites sous une couche d'environ un centimètre de lanoline anhydre même pour les cultures symbiotiques, le bacille bulgare étant indifféremment aérobie ou anaérobie.

Étant en présence de deux bacilles que nous avions appris à connaître parfaitement, et que nous savions cultiver, nous pouvions dès lors entreprendre nos recherches relatives à la façon dont ils pouvaient se comporter vis-à-vis l'un de l'autre, le bacille bulgare devant prouver s'il est réellement capable de rénover la flore putréfiante de l'intestin, et en l'espèce de s'oppo-

ser au développement ou d'empêcher les sécrétions toxiques du *bacillus putrificus*.

Ce dernier en effet offre prise de trois façons à l'action du bacille bulgare qui peut :

- 1° Entraver sa vitalité et arrêter son développement ;
- 2° Suspendre la sécrétion des poisons et des toxines ;
- 3° Amoindrir ou détruire totalement ces toxines.

Ces différentes questions, fonctions directes de la prolifération symbiotique de nos deux bacilles, feront l'objet de trois études spéciales que nous exposons ci-dessous.

Dans ces recherches, nous nous sommes appliqué à saisir quelle fonction principale le bacille bulgare mettait en œuvre pour accomplir son rôle très discuté de rénovateur. On admet en effet de façon courante, comme nous l'avons déjà vu, que le ferment bulgare triomphe de la flore intestinale par l'acidité qu'il est susceptible d'élaborer en présence des sucres et de plus par une sécrétion qui lui est particulière à laquelle on a tenté d'attribuer un pouvoir antiseptique ou antitoxique. Au cours de ce travail nous nous efforcerons donc d'apprécier si les résultats obtenus sont dus à l'une ou l'autre de ces deux fonctions défensives ou aux deux ensemble.

Nous notons ici que dans nos recherches la différenciation entre le *bacillus putrificus* et le bacille bulgare au microscope a toujours été très facile : en effet, le fond de la préparation étant éclairci par la méthode de Gram, les deux espèces restent colorées et sont facilement reconnues grâce aux spores qui accompagnent le *bacillus putrificus* et aux dimensions beaucoup plus grandes du bacille bulgare comparé au premier bacille.

1^o Le bacille bulgare entrave-t-il la vitalité et arrête-t-il le développement du *bacillus putrificus* ?

Afin de résoudre cette question, nous avons fait les expériences ci-dessous :

A) Culture à 37° en symbiose de « *bacillus putrificus* » et de bacille bulgare ensemencés en même temps.

Après un jour, bouillon trouble, très nombreux bacilles bulgares, pas de *bacillus putrificus* sauf quelques très rares spores, aucune odeur fétide caractéristique.

Après 2 jours, innombrables bacilles bulgares, pas de *bacillus putrificus* et aucune odeur spéciale.

Les jours suivants, même état de la culture, mais l'acidité du milieu augmentant grâce à la prolifération du bacille bulgare, le développement de ce dernier s'est arrêté.

Après 10 jours, il n'y avait pas encore trace de *bacillus putrificus*, pas d'odeur fétide et le bacille bulgare lui-même était en train de dépérir.

Le bacillus putrificus ne peut donc pas cultiver en présence du bacille bulgare dans un milieu lactosé, c'est-à-dire susceptible de s'acidifier sous l'action du bacille bulgare.

B) Culture à 37° en symbiose de « *bacillus putrificus* » et de bacille bulgare ensemencés en même temps. Après 24 heures de culture, alors que l'on pouvait encore retrouver quelques spores, nous avons ajouté du carbonate de chaux dans le milieu.

Après un jour, bacille bulgare seul très abondant, pas de *bacillus putrificus*.

Les jours suivants, la culture devint excessivement riche en bacilles bulgares sans pouvoir y déceler la présence du *bacillus putrificus* à part quelques spores.

Après 10 jours, le bacille bulgare était dans toute son activité (grâce au carbonate de chaux qui saturait l'acidité produite) et le *bacillus putrificus* n'avait pas pu reprendre sa vitalité et était resté sporulé.

Les spores de *bacillus putrificus*, après 24 heures de culture symbiotique dans un bouillon lactosé ne sont donc pas susceptibles de se développer en présence du bacille bulgare, alors même qu'après ces 24 heures l'acidité est détruite au fur et à mesure de sa production.

c) Culture à 37° en symbiose de « *bacillus putrificus* » et de bacille bulgareensemencés en même temps. La culture fut en outre additionnée aussitôt de carbonate de chaux.

Après un jour, culture florissante de bacille bulgare avec de rares *bacillus putrificus* et quelques spores.

Après 2 jours, quantité considérable de bacilles bulgares mais néanmoins quelques *bacillus putrificus* accompagnés de spores.

Ensuite la culture s'enrichit surtout en bacille bulgare alors que le *bacillus putrificus* avait l'air de végéter : il avait tendance à sporuler.

Après 10 jours, quantité considérable de bacilles bulgares, peu de *bacillus putrificus* montrant surtout des individus sporulés.

La présence du bacille bulgare gêne donc énormément la prolifération du *bacillus putrificus* même en culture presque neutre.

d) Culture à 37° de « *bacillus putrificus* » pendant 2 jours. Au bout de ce temps, le milieu futensemencé avec du bacille bulgare alors que la culture était extrêmement riche en « *bacillus putrificus* ».

Après un jour, on pouvait retrouver chacun des deux bacilles dans la culture.

Après 2 jours, il y avait diminution notable du bacil-

lus putrificus dont la quantité était cependant supérieure au nombre de bacilles bulgares. A partir de ce moment, la culture resta dans le même état pendant quelque temps.

Après 8 jours, le bacille bulgare avait du mal à proliférer, cependant que la culture de *bacillus putrificus* était très amoindrie.

Après 10 jours, on ne rencontrait plus que de rares *bacillus putrificus* ne prenant plus le Gram, le bacille bulgare lui-même, qui n'a d'ailleurs pas montré la même activité que dans les cultures précédentes, à cause des sécrétions du *bacillus putrificus*, s'était affaibli, détruit probablement par l'acidité et les toxines.

Une culture très florissante de *bacillus putrificus* est donc rapidement annihilée par la présence du bacille bulgare.

E) Culture à 37° de « *bacillus putrificus* » pendant 2 jours. Au bout de ce temps, le milieu futensemencé avec du bacille bulgare et additionné de carbonate de chaux alors que la culture était extrêmement riche en « *bacillus putrificus* ».

Après un jour, quantité notable de bacilles bulgares atteignant approximativement la moitié du nombre de *bacillus putrificus*.

Après 2 jours, la culture renfermait les deux bacilles dans les mêmes proportions.

Après 8 jours, la culture était dans le même état.

Après 10 jours, le *bacillus putrificus* semblait légèrement diminuer quoiqu'il subsistait. On pouvait en compter environ 2 pour 3 bacilles bulgares.

Une culture très florissante de *bacillus putrificus* additionnée de carbonate de chaux n'est donc pas sensiblement amoindrie par la présence du bacille bulgare.

F) Culture à 37° de « *bacillus putrificus* » sur le milieu obtenu en filtrant à la bougie une culture de bacille bulgare âgée de huit jours et titrant 5 gr. 949 d'acidité par litre, exprimés en acide lactique.

Après un jour, aucune trace de bacillus putrificus.

Après 2 jours, même état de la culture.

Les jours suivants, le milieu était resté limpide et ne révélait à l'examen microscopique aucune culture, même naissante.

Après 10 jours, le bacillus putrificus n'avait pas encore cultivé sur le milieu qui lui était offert.

Le bacillus putrificus n'est donc pas susceptible de se développer sur une culture filtrée de bacille bulgare, renfermant à la fois, la sécrétion particulière attribuée à ce bacille et l'acidité qu'il a produite.

G) Culture à 37° de « *bacillus putrificus* » sur le milieu obtenu en filtrant à la bougie une culture de bacille bulgare âgée de huit jours, titrant 5 gr. 949 d'acidité par litre exprimés en acide lactique mais maintenue à 100° pendant 10 minutes de façon à atténuer sinon à détruire la sécrétion propre au bacille bulgare, tout en laissant intacte l'acidité du milieu. Il est à noter qu'après l'ébullition, le volume du liquide fut ramené à son état primitif.

Après un jour, aucune trace de bacillus putrificus.

Après 2 jours, même état de la culture.

Les jours suivants, le milieu était resté limpide et ne révélait à l'examen microscopique aucune culture même naissante.

Après 10 jours, le bacillus putrificus n'avait pas encore donné de culture sur le milieu qui lui était offert.

Le bacillus putrificus n'est donc pas capable de se développer sur une culture filtrée de bacille bulgare ne renfermant qu'une légère acidité, la sécrétion propre à ce dernier bacille ayant été atténuée par la chaleur.

H) Culture à 37° de « *bacillus putrificus* » sur le milieu obtenu, en filtrant à la bougie une culture de bacille bulgare âgée de 8 jours mais dont l'acidité a été saturée par le carbonate de chaux, tout en laissant intacte la sécrétion propre à ce dernier bacille.

Après un jour, rares *bacillus putrificus* accompagnés de spores.

Après 2 jours, culture plus nette mais peu abondante.

Les jours suivants, la culture était devenue plus florissante et dégageait une odeur putride très caractéristique.

Après 10 jours, la culture était très riche en *bacillus putrificus*.

Le *bacillus putrificus* est donc susceptible de se développer sur une culture filtrée de bacille bulgare, dans laquelle l'acidité a été saturée, la sécrétion propre à ce bacille subsistant seule.

À la suite de ces différentes expériences, nous pouvons conclure que le bacille bulgare est capable d'entraver la vitalité et d'arrêter le développement du *bacillus putrificus* dans certaines conditions. Non seulement il s'oppose à sa prolifération lorsqu'on les cultive ensemble, mais il est encore susceptible de détruire une culture très florissante de ce bacille. Pour obtenir ce résultat, il est cependant indispensable, comme on a pu le voir, que l'acidité produite par la pullulation du bacille bulgare reste intégrale, la sécrétion particulière que l'on a attribuée à ce ferment n'entrant en jeu à aucun moment pour remplir un rôle antiseptique vis-à-vis du *bacillus putrificus*. Si un doute pouvait encore persister à cet égard, il serait vite anéanti par l'examen des trois derniers essais ci-dessus qui, soulignant les résultats des cinq autres expériences, mettent complè-

tement en lumière ce fait, que si l'acidité produite dans les cultures par le bacille bulgare est suffisante pour empêcher la prolifération du *bacillus putrificus*, la seule sécrétion propre à notre ferment lactique n'intervient à aucun moment pour l'aider à remplir son rôle antiseptique destiné à rénover la flore intestinale.

2° Le bacille bulgare est-il susceptible de suspendre la sécrétion des poisons et des toxines élaborés par le *bacillus putrificus* ?

Il était dans le plan de notre travail d'étudier cette question. Cependant à la suite de nos expériences précédentes, nous avons pu nous rendre compte que le bacille bulgare entravant totalement le développement du *bacillus putrificus*, il le mettait par cela même dans l'impossibilité absolue de fabriquer des toxines dont l'action nocive est incontestée dans le processus morbide de certains états inflammatoires de la muqueuse intestinale ainsi que dans les cas de gastro-entérites graves.

Nous ne pouvions donc donner libre cours à nos recherches dans ce sens et nous dûmes passer à l'étude de la troisième question.

3° Le bacille bulgare est-il capable d'atténuer ou même de détruire les toxines sécrétées par le *bacillus putrificus* ?

En dehors de la faculté qu'il offre de pouvoir s'acclimater dans l'intestin de l'homme, le bacille bulgare s'est révélé dans nos essais comme étant capable, par

l'acide lactique qu'il élabore aux dépens des sucres, de nuire énormément au développement de la flore protéolytique du tube digestif. Ensemencé dans l'intestin, il y rencontre, en effet, des bactéries extrêmement nombreuses sur lesquelles il peut exercer son pouvoir antiseptique, remplissant ainsi la principale fonction d'un véritable rénovateur intestinal. De plus, dans cet organe, il se trouve en présence de toxines sécrétées précédemment par la flore nocive de l'intestin, toxines extrêmement actives qui peu à peu imprègnent notre organisme tout entier, en le mettant en état d'infériorité par une véritable intoxication chronique. Nous pouvions alors espérer que le bacille bulgare qui était capable de lutter si énergiquement, si vaillamment même, contre l'envahissement du *bacillus putrificus*, pouvait compléter son rôle antimicrobien par une fonction antitoxique dirigée contre les produits de sécrétion de ce bacille, contre les toxines qu'il élabore aux dépens des substances albuminoïdes. C'est ce rôle antitoxique que nous tâcherons d'élucider ici.

PLAN DES RECHERCHES

Nous avons tout d'abord groupé nos recherches en deux séries selon que le bacille bulgare lui-même ou que seul son milieu de culture entraient en jeu pour atténuer la toxine du *bacillus putrificus*.

Dans la série A nous avons fait agir directement le bacille bulgare sur cette toxine.

Dans la série B nous avons fait intervenir la culture de bacille bulgare filtrée à la bougie en la mélangeant à la toxine du *bacillus putrificus*.

Nous pouvions donc juger dans ces conditions si notre

ferment lactique était susceptible par sa présence ou ses produits de sécrétion d'atténuer dans une certaine mesure les poisons élaborés par la bactérie protéolytique.

ANIMAUX TÉMOINS. — Il nous fallait cependant pouvoir disposer d'un organisme vivant pour étudier de très près, tout d'abord la toxicité des milieux de culture filtrés de *bacillus putrificus*, puis ensuite les différentes variations apportées à cette toxicité par la présence même du bacille bulgare ou seulement des produits résultant de ses fonctions biologiques.

Nous avons à cet effet choisi le cobaye comme étant capable de servir de témoin dans les différentes expériences que nous allons exposer.

INOCULATIONS. — Chaque inoculation fut faite à une série de 6 cobayes de même poids, de façon à pouvoir tirer de nos recherches un résultat certain, sans risquer de courir l'aléa de fausses interprétations dues à des accidents isolés consécutifs au choc opératoire ou à des causes étrangères à l'inoculation.

L'injection de toxine a toujours été faite à chacun de ces animaux dans le faisceau musculaire du membre postérieur droit, après avoir eu soin d'épiler et d'aseptiser la région destinée à l'inoculation. La petite plaie fut enfin obturée chaque fois par une goutte de collodion. Dans ces conditions, nous avons toujours pu nous rendre compte très exactement de l'action du produit injecté en ayant soin de noter l'heure de l'inoculation, la température des animaux ainsi que leur poids.

Nous avons préféré l'injection intra-musculaire, qui permettait une diffusion suffisamment rapide de la toxine dans le torrent circulatoire, à l'injection intra-veineuse, dans la jugulaire, qui nous aurait demandé de faire intervenir une petite opération préparatoire dont

la réaction consécutive eût pu légèrement fausser les résultats obtenus.

PRÉPARATION DE LA TOXINE DU *BACILLUS PUTRIFICUS*. — Ayant déjà pu apprécier la facilité avec laquelle nos deux micro-organismes proliféraient séparément sur le bouillon de viande peptoné, lactosé, additionné de blanc d'œuf, qui fut décrit précédemment, nous avons voulu faire intervenir à nouveau ce milieu de culture dans nos recherches.

Après avoirensemencé une certaine quantité de ce bouillon avec du *bacillus putrificus* et après avoir fait le vide dans le ballon qui le renfermait, nous l'avons maintenu à l'étuve à 37° pendant 4 jours. Au bout de ce temps, le produit obtenu, très riche en *bacillus putrificus* fut filtré à la bougie et conservé aseptiquement.

Nous devons avouer cependant que nous avons fait absolument fausse route, car la toxine obtenue, injectée à des cobayes de 500 gr., aux doses progressives de 5 centimètres cubes, de 10 centimètres cubes, de 15 centimètres cubes, et même à la dose énorme de 20 centimètres cubes, ne les a que très légèrement incommodés : pas de température, légère paralysie du train inférieur, durant de huit à douze heures et jamais d'issue fatale.

La toxine ainsi préparée était donc absolument inactive et inutilisable pour nos expériences. Recherchant les causes de cette non-réussite, nous sommes arrivé à pouvoir discerner que le blanc d'œuf, en tant que matière albuminoïde, offre un champ beaucoup moins propice que la viande à l'action protéolytique du *bacillus putrificus*.

Nous nous sommes donc efforcé de préparer notre toxine sur un milieu renfermant de la chair musculaire. Pour ce faire, nous basant sur l'étude de Metchnikoff (1)

(1) Metchnikoff, Etudes sur la Flore intestinale, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908, page 952.

relative aux bactéries protéolytiques, nous avons préparé un bouillon composé de viande de bœuf très finement hachée que nous avons simplement recouvert d'eau. Ce milieu stérilisé, puisensemencé avec le *bacillus putrificus*, nous avons fait le vide dans le ballon qui fut porté à l'étuve à 37° où nous l'avons maintenu pendant 4 jours. Ce délai peut paraître trop court pour obtenir une toxine réellement active, mais nous avons cru ne pas devoir le prolonger pour éviter que le bacille lui-même ne vienne à détruire cette toxine, comme cela se produit à la longue ainsi que l'a fait remarquer Metchnikoff (1).

Le liquide ainsi obtenu fut filtré tout d'abord sur un papier, puis ensuite à la bougie. Il fut enfin recueilli et conservé dans des récipients aseptiques. La toxine préparée de cette façon s'est toujours montrée très active sur les cobayes et put servir utilement à notre expérimentation.

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE TOXICITÉ. — Nous avons appelé dans le compte rendu de nos expériences : coefficient de toxicité, la quantité minimum X de toxine préparée comme ci-dessus suffisante pour tuer un cobaye de 500 gr. en moins de 12 heures.

Pour déterminer ce coefficient nous avons dû opérer par tâtonnement, en faisant des inoculations successives, à des doses progressives et en injectant à chaque fois un sujet nouveau afin d'éviter les erreurs qui se seraient fatalement produites par suite d'accoutumance de l'organisme et surtout par la formation d'antitoxines dans le sang des animaux d'expérience.

Avant tout cependant nous avons dû nous assurer par un essai que le bouillon servant de véhicule à notre toxine n'était pas toxique pour le cobaye. Nous avons

(1) Metchnikoff, Etudes sur la Flore intestinale, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908, page 952.

ainsi pu voir que même une dose de 20 centimètres cubes de ce bouillon ne provoquait aux animaux témoins aucun trouble de l'organisme.

Nous nous sommes dès lors appliqué à déterminer très exactement la valeur de notre toxine et à tirer de nos recherches le coefficient cherché.

Pour ce faire, nous avons injecté à des séries de 6 cobayes d'abord 5 centimètres cubes, puis 10 centimètres cubes, puis 15 centimètres cubes de notre toxine. Les animaux qui ont reçu 5 et même 10 centimètres cubes se sont bien comportés, mais ceux qui ont reçu 15 centimètres cubes sont tous morts dans un laps de temps, plus ou moins long variant de une à dix heures. Notre toxine était donc mortelle pour les animaux d'expérience à une dose oscillant entre 10 et 15 centimètres cubes pour 500 gr. de poids vif. Il est à noter cependant que les animaux qui ont reçu 10 centimètres cubes de toxine ont montré, environ quarante-huit heures après l'injection, les uns des abcès locaux, les autres des lésions cutanées s'accompagnant d'écoulements purulents fétides. Ces derniers accidents se sont manifestés surtout à la paroi abdominale et dans un cas en particulier, ce sont les paupières et les yeux qui ont souffert de l'infection. Aucun d'entre eux cependant n'est mort.

Pour trouver la dose exacte de toxine devant amener une issue fatale, une autre série de cobayes fut injectée à 13 centimètres cubes. Tous ont survécu à cette inoculation, bien que réagissant énergiquement et présentant des phénomènes très marqués de paralysie des membres inférieurs, paralysie commençant environ une demi-heure après l'injection et durant 2 à 3 heures, sans laisser aucune trace ensuite sur les animaux. C'est d'ailleurs cette paralysie qui a toujours amené la mort des cobayes soumis à 15 centimètres cubes de toxine,

car elle se manifeste beaucoup plus tôt et l'animal meurt par arrêt du cœur.

On peut retracer de la façon suivante les phénomènes précédant leur mort. L'animal, aussitôt l'inoculation, fait quelques pas puis tombe sur le côté. Il se relève rapidement, court, s'agite et tombe à nouveau. Ces alternatives de surexcitation et de calme se répètent deux ou trois fois. Pendant les périodes d'immobilité, les yeux et les paupières restent fixes, puis la respiration devient saccadée. Se soulevant alors avec peine, l'animal se traîne à l'aide des membres supérieurs. Après quelques pas, il tombe à nouveau pour ne plus se relever. Le train-arrière se raidit complètement, la cage thoracique ne se dilate qu'à peine. La respiration très lente devient bruyante et n'est plus visible que par les oscillations de l'abdomen. De brusques soubresauts secouent alors l'animal tout entier. Dès lors, les mouvements respiratoires deviennent nuls, les membres supérieurs se raidissent à leur tour et l'animal meurt toujours dans un dernier soubresaut.

Nous pouvions donc, à la suite de nos essais, donner au coefficient de toxicité de notre toxine la valeur de 15. Ainsi renseigné sur le pouvoir toxique de la culture filtrée du *bacillus putrificus*, nous avons commencé nos expériences, nous servant toujours de la même toxine que nous avons préparée en quantité suffisante pour pouvoir être utilisée dans tous nos essais.

EXPÉRIMENTATION

Série A. — Comme nous l'avons exposé plus haut, nous voulions voir dans ces recherches, si la culture du bacille bulgare était susceptible d'apporter une atténuation à la toxicité des produits de sécrétion du *bacillus putrificus*.

Avant de procéder à nos essais, nous avonsensemencé 100 centimètres cubes de toxine avec le bacille bulgare en ayant soin d'ajouter dans la culture 4 % de lactose, élément indispensable au développement du ferment lactique. Nous avons laissé cette culture 5 jours à l'étuve à 37° pendant lesquels nous nous sommes assuré plusieurs fois que le bacille bulgare proliférait bien dans le milieu qui lui était offert. La culture filtrée à la bougie, titrant 5 gr. 385 d'acide lactique par litre, était alors prête à être inoculée.

Cependant nous devions avant tout nous assurer que la présence du lactose dans la toxine n'atténuait en aucune façon sa toxicité. Pour ce faire, nous avons injecté à des cobayes une dose de toxine lactosée à 4 % correspondant pour chacun d'eux à 15 centimètres cubes pour 500 gr. de poids vif, c'est-à-dire exactement le coefficient de toxicité. Dans tous les cas, les cobayes sont morts, attestant par cela même que la présence du lactose n'entravait en aucune façon l'action nocive de la toxine. De plus, nous nous sommes rendu compte que l'acidité élaborée par le bacille bulgare dans un bouillon lactosé ne provoquait, à l'inoculation, aucun trouble de l'organisme du cobaye. Nous pouvions donc être certain que, si, d'une part, le lactose n'atténuait pas la toxine, la culture du bacille bulgare sur le bouillon servant de véhicule à cette toxine ne venait pas exagérer, d'autre part, sa toxicité.

Nous avons alors procédé à l'essai suivant :

Nous avons pris une série de 6 cobayes dont nous avons noté très exactement le signalement, la température ainsi que le poids. Nous avons alors injecté à chacun d'eux une dose de toxine lactosée où avait poussé le bacille bulgare, filtrée, dont nous avons exposé ci-dessus la préparation, dose correspondant exactement pour chaque animal au coefficient de toxicité pour 500 gr. de poids vif.

Trois de ces animaux sont morts en moins d'une demi-heure, les autres présentant des phénomènes de paralysie intense dont ils se sont remis pendant quelques heures ; mais au bout de 4 heures, l'un d'entre eux succombait sans laisser bien loin les deux autres qui mouraient au bout de 8 et de 9 heures.

L'expérience a donc été très concluante puisque tous les animaux témoins sont morts. La culture du bacille bulgare sur notre toxine était donc incapable d'atténuer, en quelque façon que ce soit, sa toxicité.

Quoique peu encouragé par cet essai, nous avons voulu nous assurer, malgré cet échec, si la culture du bacille bulgare sur un autre milieu, filtrée après cinq jours d'étuve, pouvait atténuer la toxine du *bacillus putrificus*.

Série B. — Pour mener à bien cet essai, nous avons cultivé à 37° le bacille bulgare sur le bouillon de viande peptoné, lactosé, dont nous avons donné la formule précédemment. Cette culture maintenue à l'étuve pendant cinq jours fut filtrée à la bougie ; elle titrait alors 5 gr. 48 d'acide lactique par litre. Comme ce produit était destiné à être inoculé mélangé à la toxine, nous avons dû nous documenter à l'aide de quelques expériences complémentaires de façon à donner à nos recherches toute l'exactitude désirable. Opérant chaque fois sur une série de cobayes, nous avons ainsi pu nous rendre compte :

1° Que le bouillon peptoné, lactosé, n'est pas mortel pour le cobaye même à la dose de 20 centimètres cubes ;

2° Que la culture filtrée du bacille bulgare sur le même bouillon après cinq jours d'étuve n'agit pas davantage sur les animaux à cette même dose ;

3° Qu'un mélange de toxine et de bouillon, peptoné, lactosé, correspondant pour l'un des composants au coefficient de toxicité, et pour l'autre à un volume égal, n'amène aucune atténuation à la valeur toxique de ce coefficient ;

4° Enfin qu'un volume de 30 centimètres cubes d'eau stérilisée est très bien supporté par le cobaye en injection intra-musculaire.

Ainsi prémuni contre les fausses interprétations inhérentes à l'emploi d'un nouveau véhicule, nous avons procédé à l'expérience suivante :

Nous avons pris une série de 6 cobayes dont nous avons noté très exactement le signalement, la température ainsi que le poids.

Nous avons alors injecté à chacun d'eux une dose de toxine, égale au coefficient de toxicité, mélangée d'un même volume de culture filtrée de bacille bulgare. Cette dose correspondait pour la toxine à son coefficient de toxicité et pour la culture filtrée à 15 centimètres cubes pour 500 gr. de poids vif.

L'un des animaux d'expérience est mort presque aussitôt, deux autres ont succombé 3 heures après l'injection, un quatrième a survécu encore 2 heures, le cinquième est mort après 24 heures. Le dernier a résisté pendant 48 heures, quoique atteint de paralysie, presque aussitôt après l'injection du liquide.

Cet essai prouvait encore que les sécrétions du bacille bulgare mélangées à la toxine du *bacillus putrificus* n'avaient aucune action antitoxique vis-à-vis d'elle. Nous avons remarqué cependant que si la mort des deux derniers animaux d'expérience s'est produite plus tardivement que dans l'essai précédent, nous croyons pouvoir l'attribuer à ce fait, que la toxine se trouvant diluée à 50 % du volume injecté, son action, sans être amoindrie comme toxicité, était cependant plus lente, la quantité totale de liquide à résorber se trouvant augmentée d'un volume double.

La mort des quatre premiers cobayes est survenue suffisamment tôt toutefois pour pouvoir tirer de cet essai l'enseignement que nous en attendions.

CONCLUSIONS

Des différentes recherches que nous venons de faire, nous croyons pouvoir formuler les conclusions suivantes :

1° Le bacille bulgare traverse indemne le tube digestif de l'homme ;

2° Il est susceptible de survivre dans l'intestin pendant un temps variant de cinq à dix jours ;

3° Le véhicule qui permet un ensemencement de l'intestin le plus marqué est le bouillon de culture obtenu en faisant une décoction de touraillons d'orge peptonée à laquelle on ajoute du lactose ;

4° Le régime n'influe pas sensiblement sur l'acclimation du bacille bulgare dans l'intestin ;

5° Ce même bacille empêche la prolifération du *bacillus putrificus* et amoindrit même les cultures très florissantes de ce bacille, en milieu lactosé, c'est-à-dire susceptible de s'acidifier sous l'action du bacille bulgare ;

6° Cette action antiseptique s'opère uniquement grâce à l'acide lactique élaboré par le bacille bulgare et jamais par les sécrétions qui lui sont propres ;

7° Le bacille bulgare ne remplit aucune fonction antitoxique vis-à-vis de la toxine du *bacillus putrificus* ;

8° Les sécrétions de ce ferment lactique n'apportent aucune atténuation à la toxicité des poisons élaborés par la bactérie protéolytique.

En un mot, le bacille bulgare, absorbé en bouillon végétal lactosé (milieu de Bertrand), sans que le malade ait à suivre de régime spécial, produit un ensemencement passager de l'intestin qui, sans avoir le caractère

d'une acclimatation véritable, permet à ce bacille de mettre en œuvre son pouvoir acidogène antiseptique contre les bactéries protéolytiques renfermées dans cet organe.

Refusant au bacille bulgare une fonction antitoxique, nous sommes toutefois amené par les faits à admettre que sa présence dans l'intestin est précieuse pour lutter contre l'envahissement de la flore putréfiante, et c'est déjà plus que suffisant pour reconnaître le bien-fondé de la bactériothérapie lactique étayée sur des bases scientifiques.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la thèse,
L. GRIMBERT.

Vu :
Le Directeur de l'Ecole,
H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
L. LIARD.

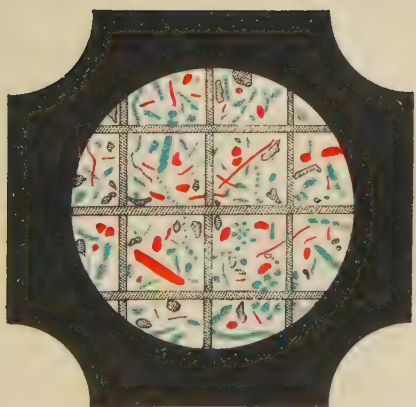




Bacille Bulgare isolé
ayant servi à nos recherches



Bacille Bulgare
Type de l'Institut Pasteur



Aspect d'une lame
disposée pour la numération



Bacillus
Putrificus

